

**Nachweis einer Myocardproteinfraktion
mit Hilfe eines Latex Antigen-Antikörper Testes
unter Verwendung von Polyäthylenglykol**

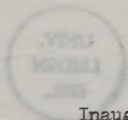
Gerhard Giebl

1977

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof.Dr. N. Zöllner

Nachweis einer Myocardproteinfraktion mit Hilfe
eines Latex Antigen - Antikörper Testes unter
Verwendung von Polyäthylenglykol



Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gerhard Giebl

aus

Pöing

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Nowy
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. N. Zöllner
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 7.6.1977	



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Vorwort	1
II. Inhalt	2
1. Einleitung	3
2. Beschreibung der Aufgabenstellung	4
3. Ziel des Projekts	5
4. Beschreibung der ersten 5 Phasen	6
5. Beschreibung der zweiten 5 Phasen	7
6. Beschreibung der dritten 5 Phasen	8
III. Ergebnisse	9
1. Ergebnisse der ersten 5 Phasen	10
2. Ergebnisse der zweiten 5 Phasen	11
3. Ergebnisse der dritten 5 Phasen	12
4. Ergebnisse der vierten 5 Phasen	13
5. Ergebnisse der fünften 5 Phasen	14
6. Ergebnisse der sechsten 5 Phasen	15
7. Ergebnisse der siebten 5 Phasen	16
8. Ergebnisse der achten 5 Phasen	17
9. Ergebnisse der neunten 5 Phasen	18
10. Ergebnisse der zehnten 5 Phasen	19
11. Ergebnisse der elften 5 Phasen	20
12. Ergebnisse der zwölften 5 Phasen	21
13. Ergebnisse der dreizehnten 5 Phasen	22
14. Ergebnisse der vierzehnten 5 Phasen	23
15. Ergebnisse der fünfzehnten 5 Phasen	24
16. Ergebnisse der sechzehnten 5 Phasen	25
17. Ergebnisse der siebenzehnten 5 Phasen	26
18. Ergebnisse der achtzehnten 5 Phasen	27
19. Ergebnisse der neunzehnten 5 Phasen	28
20. Ergebnisse der zwanzigsten 5 Phasen	29
21. Ergebnisse der einundzwanzigsten 5 Phasen	30
22. Ergebnisse der zweiundzwanzigsten 5 Phasen	31
23. Ergebnisse der dreiundzwanzigsten 5 Phasen	32
24. Ergebnisse der vierundzwanzigsten 5 Phasen	33
25. Ergebnisse der fünfundzwanzigsten 5 Phasen	34
26. Ergebnisse der sechsundzwanzigsten 5 Phasen	35
27. Ergebnisse der siebenundzwanzigsten 5 Phasen	36
28. Ergebnisse der achtundzwanzigsten 5 Phasen	37
29. Ergebnisse der neunundzwanzigsten 5 Phasen	38
30. Ergebnisse der hundertsten 5 Phasen	39

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	7
II. Methode	8
1. Reagenzien	8
2. Konzentration der Latexpartikel	10
3. Wahl des Puffers	10
4. Herstellung der Latex - Reagenzien	10
5. Durchführung der Agglutinationsversuche	11
6. Beurteilung der Agglutinationsergebnisse	12
III. Ergebnisse	13
1. Versuche mit einem unbeladenen Latex - Reagenz	13
2. Agglutinationsreaktionen zwischen menschlichem IgG und einem mit Anti IgG beladenen Latex - Reagenz	15
3. Agglutinationsreaktionen zwischen Anti IgG und einem mit menschlichem IgG beladenen Latex - Reagenz	22
4. Agglutinationsreaktionen zwischen Latexreagenzien, die mit Kaninchen IgG - Anti M1 beladen wurden und Präparaten aus menschlichem Myocard	26
5. Versuche mit denen nachgewiesen wurde, daß bei den vorangehenden Agglutinationsreaktionen Antigen - Antikörper - Reaktionen zwischen M1 und Anti M1 stattfanden	29
6. Prüfung der Organspezifität des Reagenz M1	32
7. Seren verschiedener Patienten werden auf ihr Verhalten gegenüber Anti M1 untersucht	33
1. 25 unausgewählte Seren stationärer Patienten	34
2. Seren von Patienten mit positivem Rheumafaktor	34
3. Seren von Infarktpatienten	35
IV. Diskussion	37
1. Über den Latex - Test	37
2. Polyäthylenglykol	39
3. Über die Substanz M1 und Anti M1	40
V. Zusammenfassung	42
VI. Literatur	43

I. EINLEITUNG

Bei vielen menschlichen Erkrankungen wäre es wünschenswert, im Serum des Erkrankten organspezifische Substanzen nachweisen und damit die Schädigung dieser Organe beweisen bzw. ausschließen zu können.

Zum Nachweis einer Myocarderkrankung gab es keine Substanz, die diese Bedingung erfüllte. Erst das in den letzten zehn Jahren untersuchte Isoenzym der Creatinkinase (CK MB) scheint diesem Ziel sehr nahe zu kommen.

Unsere Untersuchung betrifft eine Gruppe von menschlichen Herzmuskelproteinen, die von NOWY [17, 18] durch präparative Elektrophorese isoliert wurde. Es handelt sich um Proteine, die nur elektrophoretisch definiert sind, die Mobilität von γ -Globulinen haben und die mit Serumproteinen immunologisch nicht identisch oder verwandt sind. Sie enthalten unter anderem das Isoenzym MM der Creatinkinase und ein Isoenzym der GOT.

Ein gegen diese Proteingruppe gerichtetes von Kaninchen gewonnenes Antiserum bzw. die daraus abgetrennten Immunglobuline wurden mir für diese Untersuchung zur Verfügung gestellt.

Unsere Aufgabe bestand darin, zu untersuchen, ob es möglich ist mit Hilfe eines Latex-Objektträger-Tests eine Antigen - Antikörper - Reaktion zwischen den genannten Substanzen sichtbar zu machen. Außerdem sollte untersucht werden, in wie weit eine Organspezifität der isolierten Proteine feststellbar ist und ob bei bestimmten Herzerkrankungen ein Nachweis dieser Proteine mit unserer Methode möglich ist.

II. METHODE

1. Reagenzien, die für unsere Untersuchungen verwendet wurden

In dieser Zusammenstellung werden alle verwendeten Reagenzien beschrieben und nummeriert. In den folgenden Ausführungen wird, wenn nötig darauf verwiesen.

- R1. Dow Latex Trockensubstanz 10%
 Partikelgröße 0,794 μ
 Hersteller: Serva Feinbiochemica Heidelberg
- R2. Boratpuffer wurde entsprechend den Angaben von SINGER und
 PLOTZ [22,23] hergestellt:
 0,1 m Borsäure 500 ml
 0,1 n NaOH 59 ml
 NaCl 8,5 gr
 Aqua dest.ad 1000 ml
 pH 8,2
- R3. Polyäthylenglykol Type 40 000
 M 35 000 - 40 000
 Hersteller: Serva Feinbiochemica Heidelberg
- R4. γ Globulin lyophil.rein ca 97%
 aus Humanserum (Cohnfraktion II)
 Hersteller: Serva Feinbiochemica Heidelberg
- R5. Goat Antiserum to Human Immunoglobulins (IgG, IgM, IgA)
 Hersteller: Hyland LOT NO 8202V003A1
- R6. " M1 " (E₇₋₁₁) Ein Präparat aus menschlichem Myocard, das von
 NOWY [17,18] in einem speziellen Verfahren her-
 gestellt wurde. Es stand für die Versuche ge-
 friergetrocknet zur Verfügung. Das Präparat
 enthielt ca 11% Eiweiß und 89% Pufferbestand-
 teile (R12).

R7. Anti "M1" (E₇₋₁₁) Mit dem Präparat M1 war ein Kaninchen immunisiert worden um Antikörper gegen M1 zu erhalten. Aus dem Kaninchenserum wurde die Globulinfraction isoliert und gefriergetrocknet. Dieses Präparat wurde als " Anti M1 " bezeichnet. Es enthielt 28% Eiweiß und 72% Pufferbestandteile (R12).

R8. Leber Menschliche Leber war homogenisiert und dann ultrafiltriert worden. Der Überstand wurde gefriergetrocknet.

R9. Musculus psoas Dieses Präparat wurde wie Nr.8 hergestellt.

R10. Myocard Dieses Präparat wurde wie Nr.8 hergestellt.

R11. Verschiedene Seren von gesunden und erkrankten Personen
Näheres wird bei den damit durchgeführten Versuchen mitgeteilt.

R12. Tris-E Puffer	Tris	60,5 g
	EDTA II	6,0 g
	Borsäure	4,6 g
	Aqua dest.	ad 1000 ml

2. Konzentration der Latexpartikel in den Latexreagenzien

Das im Handel befindliche Latex (Dow Latex, Serva Heidelberg) mußte bei der Herstellung der verschiedenen Latexreagenzien in geeigneter, gleichbleibender Weise verdünnt werden. Um ein brauchbares Verdünnungsverhältnis zu ermitteln, wurden in einem kurzen Vorversuch einige Verdünnungen von Latex mit Wasser hergestellt.

Wir verglichen die entsprechenden Lösungen mit käuflich zu erwerbenden Latexreagenzien und gingen dabei von folgender Forderung aus:

nach dem Mischen von einem Tropfen Pufferlösung, einem Tropfen Testlösung und einem Tropfen Latexreagenz auf einer schwarzen Glasplatte sollte eine homogene, gerade noch deutlich milchig - trübe Lösung entstehen. Wir stellten folgende Verdünnung der Latexlösung her:

5, 10, 15, 20 und 30% ige Lösungen. Diese kurzen Vorversuche ergaben, daß sich für unsere Versuche eine 10 bis 15% Verdünnung zur Herstellung der Latexreagenzien eignete. Wir entschieden uns für eine 12%ige Verdünnung.

3. Wahl des Puffers

Aus Literaturangaben und von im Handel befindlichen Reagenzien war uns bekannt, daß sich der Boratpuffer für diese Versuche gut eignet. Deshalb verwendeten wir für alle unsere Versuche den unter "Reagenzien" genau beschriebenen Puffer.

4. Herstellung der Latexreagenzien

Alle Latexreagenzien wurden auf gleiche Weise hergestellt. Sie unterschieden sich nur in zwei Punkten:

1. bei einem Teil der Latex - Reagenzien wurde Polyäthylenglykol zugefügt,
2. es wurden verschiedene IgG Präparate und unterschiedliche Mengen an die Latexpartikel angelagert.

Herstellungsverfahren

Bei Zimmertemperatur wurden folgende Arbeitsgänge ausgeführt:

1. Polyäthylenglykol abgewogen (wenn es für das Latex - Reagenz verwendet wurde),
2. Boratpuffer pipettiert und darin das Polyäthylenglykol gelöst,
3. Dow Latex dazu pipettiert und das ganze gut gemischt,
4. zuletzt wurde das jeweilige IgG Präparat abgewogen und in Portionen von 5 mg in die Lösung gegeben und dabei kräftig gemischt (Whirlmix).

5. Durchführung der Agglutinationsversuche

Es war unser Ziel mit Hilfe eines einfachen direkten Latextests das Vorhandensein von " M1 " (R6) in einer Lösung nachzuweisen. Essollte also in Anwesenheit von " M1 " beim Agglutinationstest eine Agglutination makroskopisch sichtbar werden. Dementsprechend sollte beim Fehlen von " M1 " die Latexlösung homogen bleiben.

Wir orientierten uns dabei an dem handelsüblichen Latextest "Gonavislide", mit dem Schwangerschaftsteste durchgeführt werden. Die Versuchsdurchführung wurde aber gegenüber diesem Test abgeändert, da für unsere Versuche wenig Material zur Verfügung stand, aber doch eine ganze Reihe Agglutinationsteste durchgeführt werden mußte. So benützten wir geringere Mengen und verteilten diese auf eine entsprechend kleinere Fläche.

Auf einer schwarzen Glasplatte wurden bei Zimmertemperatur folgende Arbeitsgänge ausgeführt:

1. 10 µl Boratpuffer wurden mit einer Mikroliterpipette (Sherwood) pipettiert.
2. Dazu wurden 10 µl der zu testenden Flüssigkeit pipettiert und dann beides mit einem Stäbchen gut gemischt.
3. 10 µl Latex - Reagenz wurden jetzt zugegeben.
4. Das Ganze wurde mit einem Stäbchen gut vermischt und auf eine Fläche von etwa 1,5 cm² verteilt.
5. Die Glasplatte wurde drei Minuten langsam rotierend bewegt und während dieser Zeit das Verhalten der Lösung beobachtet.
6. Drei Minuten nach Zumischen des Latex - Reagenz wurde das Ergebnis des Versuchs abgelesen.

6. Beurteilung der Agglutinationsergebnisse

Um alle Versuche in gleicher Weise zu beurteilen und damit Vergleiche zu ermöglichen, mußten für die Beurteilung entsprechende Kriterien festgelegt werden.

Grundsätzlich wurden alle Agglutinationsergebnisse mit freiem Auge beurteilt, d.h. auf eine makroskopisch sichtbare Agglutination geprüft. Außerdem mußten die Ergebnisse spätestens 3 - 4 Minuten nach Auftragen der Lösungen auf die Glasplatte abgelesen werden. Danach beginnt die Lösung einzutrocknen, das Ergebnis wird dadurch verfälscht. Für die Beurteilung einer Agglutination können prinzipiell zwei Gesichtspunkte herangezogen werden:

1. Die Größe der agglutinierten Partikel, die nach einer festgelegten Zeit (z.B. 3 Min) erreicht wird. Mit freiem Auge ist eine Beurteilung dieser Größe nur schwer möglich und hängt weitgehend von subjektiven Faktoren ab.
2. Die Zeit, die gemessen werden kann vom Zumischen des Latex-Reagenz bis zum Sichtbarwerden der Agglutinationsreaktion. Da die Zeit sehr einfach gemessen werden kann, wurde diese Methode für die Auswertung unserer Agglutinationsreaktion angewandt.

Als Symbole für die Beurteilung eines Agglutinationstests legten wir fest: - / (+) / + / ++ / +++ also von negativ bis dreifach positiv. Diesen Symbolen ordneten wir folgende Agglutinationsergebnisse zu:

- keine Agglutination, die Lösung bleibt für 3 - 4 Minuten nach Zumischen von Latex - Reagenz homogen,
- (+) schwach positiv, erst kurz vor dem endgültigen Ablesen, d.h. 2,5 bis 3 Minuten nach Zumischen von Latex - Reagenz ist eine Agglutination zu erkennen,
- + einfach positiv, 1,5 - 2,5 Minuten nach Zumischen von Latex-Reagenz kann eine Agglutination festgestellt werden,
- ++ doppelt positiv, hier tritt die Agglutination 0,5 - 1,5 Minuten nach Zumischen von Latex - Reagenz auf,
- +++ dreifach positiv, unmittelbar nach Zumischen von Latex - Reagenz bis spätestens 0,5 Minuten danach ist eine Agglutination zu beobachten.

Mit dieser Art der Auswertung kamen wir gut zurecht, es traten dabei keine Schwierigkeiten auf.

III. ERGEBNISSE

1. Versuche mit einem unbeladenen Latex - Reagenz

Bevor Versuche mit beladenen Latex - Reagenzien gemacht wurden, wollten wir das Verhalten unbeladener Latexpartikel gegenüber dem später immer wieder zum Lösen und Verdünnen verwendeten Boratpuffer und menschlichem Serum untersuchen. Da bei bestimmten Antigen - Antikörper - Reaktionen das Komplement eine wichtige Rolle spielt, wurde einerseits frisches, andererseits inaktiviertes menschliches Serum für die Agglutinationsversuche verwendet.

Herstellung des Latex - Reagenz LR I:

Boratpuffer (R2)	0,88 ml
Dow - Latex (R1)	0,12 ml

Das Herstellungsverfahren wurde auf Seite 10 beschrieben.

Geprüfte Substanzen:

1. Boratpuffer (R2)
2. Frisches Mischserum von gesunden Personen
3. Dasselbe Serum inaktiviert
(im Wasserbad bei 56° C, 30 Minuten)

Durchführung der Versuche:

wie in der Methode Seite 11 beschrieben

Ergebnisse:	LR Nr.	Boratpuffer	frisches	inaktiviertes
Tab.1			Humanserum	Humanserum
	I	+	++	-

Während inaktiviertes Serum wie erwartet ein negatives Ergebnis zeigte, waren die Agglutinationsreaktionen mit frischem Serum doppelt positiv. Auch mit Boratpuffer erhielten wir eine doppelt positive Agglutination. Da bei beiden positiven Reaktionen keine Antigen - Antikörper - Reaktion stattgefunden haben konnte, mußte es sich um eine Spontanagglutination handeln. Wie sich in späteren Versuchen zeigte, verschwand die Agglutinationsbereitschaft gegenüber frischem Serum, das kein Antigen enthielt, nach dem Beladen des Latex - Reagenz mit Antikörpern. Dagegen blieb die Spontanagglutination gegenüber Boratpuffer fast vollständig erhalten. Dies wurde in vielen Vorversuchen als sehr störend empfunden.

den und veranlaßte uns, nach einer Möglichkeit zu suchen, diese Spontanagglutination zu unterdrücken.

Bei der Suche nach einem "Stabilisator", der diese Spontanagglutination verhindert, stießen wir auf Polyäthylenglykol. In orientierenden Vorversuchen schien diese Substanz eine entsprechende Wirkung auf die Agglutinationsversuche auszuüben. Zur näheren Untersuchung dieser Wirkung wurden vier unbeladene Latex - Reagenzien mit unterschiedlicher Polyäthylenglykol - Konzentration hergestellt.

Herstellung der Latex - Reagenzien:

Nr.	LR II	LR III	LR IV	LR V
Polyäthylenglykol (R3)	5 mg	10 mg	15 mg	20 mg
Boratpuffer (R2)	0,88 ml	0,88 ml	0,88 ml	0,88 ml
Dow - Latex (R1)	0,12 ml	0,12 ml	0,12 ml	0,12 ml

Das Herstellungsverfahren wurde auf Seite 10 beschrieben.

Geprüfte Substanzen:

1. Boratpuffer (R2)
2. Frisches Mischserum von gesunden Personen
3. Dasselbe Serum inaktiviert
(im Wasserbad bei 56°C 30 Minuten inkubiert)

Durchführung der Versuche: wie in der Methode Seite 11 beschrieben

Ergebnisse:

Tab.2			
LR Nr.	Boratpuffer	frisches Humanserum	inaktiviert. Humanserum
II	(+)	(+)	-
III	-	(+)	-
IV	-	+	-
V	-	+	-

Verglichen mit den Agglutinationsergebnissen des Latex - Reagenz I (ohne Polyäthylenglykol) waren alle Spontanagglutinationen bei den Latex - Reagenzien II bis V (mit Polyäthylenglykol) stark unterdrückt. Je nach Konzentration des Polyäthylenglykol waren die Ergebnisse un-

terchiedlich. So nahm die Agglutinationsbereitschaft gegenüber Boratpuffer mit steigender Polyäthylenglykolkonzentration ab und mußte ab Latex - Reagenz III als negativ beurteilt werden. Auch das Verhalten gegen frisches menschliches Serum war wesentlich besser. Die Bereitschaft zur Spontanagglutination verschwand aber nicht vollständig. Bei diesen Versuchen brachten die Latex - Reagenzien mit niedriger Polyäthylenglykolkonzentration II und III die besseren Ergebnisse. Mit diesen Reagenzien erhielten wir schwach positive, mit den Latex - Reagenzien IV und V dagegen einfach positive Agglutinationen.

Gegen inaktiviertes menschliches Serum verhielten sich alle Latex-Reagenzien gleich, d.h. die Agglutinationsreaktionen waren alle negativ.

Das Latex - Reagenz III erwies sich also als dasjenige, das unseren Vorstellungen am nächsten kam. Die Agglutinationsreaktion mit Boratpuffer war negativ und mit frischem Humanserum erhielten wir nur ein schwach positives Ergebnis. Erwähnt werden muß, daß die Reaktion mit Boratpuffer auch nach 10 Minuten noch negativ blieb. Bei späteren Versuchen war es dadurch möglich in Zweifelsfällen noch nach vier Minuten das Ergebnis eines Agglutinationstestes zu beurteilen. Diese Ergebnisse veranlaßten uns, bei den nachfolgenden Versuchen Latex - Reagenzien ohne Polyäthylenglykol zu vergleichen mit Latex - Reagenzien, die Polyäthylenglykol enthielten.

2. Agglutinationsreaktionen zwischen menschlichem IgG und einem mit Anti IgG beladenen Latex - Reagenz

Zum Einen sollten in diesen Versuchen Erfahrungen über das Verhalten beladener Latex - Reagenzien gewonnen werden, zum Anderen wurde es in späteren Versuchen notwendig, Human IgG in einem Präparat aus Myocard nachzuweisen. Aus diesen zwei Gründen wurde Antiserum gegen IgG gefriergetrocknet und mit dem erhaltenen Material versucht, ein brauchbares Latex - Reagenz herzustellen. Zuerst untersuchten wir Latex - Reagenzien mit unterschiedlicher Antiserumkonzentration.

Herstellung der Latex - Reagenzien:

Nr.	LR VI	LR VII	LR VIII	LR IX
Boratpuffer (R2)	0,88 ml	0,88 ml	0,88 ml	0,88 ml
Dow - Latex (R1)	0,12 ml	0,12 ml	0,12 ml	0,12 ml
lyophilisiertes				
Antiserum (R5)	5 mg	9 mg	17 mg	24 mg

Das Herstellungsverfahren wurde auf Seite 10 beschrieben.

Gepriifte Substanzen:

1. Goat Antiserum (R5)
2. Frisches menschliches Normalserum (R 10)
3. Boratpuffer (R2)

Durchfuehrung der wie in der Methode Seite 11 beschrieben

Versuche:

Ergebnisse:

Tab. 3

LR Nr.	Goat Antiserum	Frisch.menschl. Normalserum	Boratpuffer
VI	+	(+)	(+)
VII	(+)	(+)	(+)
VIII	-	-	(+)
IX	-	-	(+)

Die beiden Latex - Reagenzien VI und VII mit niedriger Antiserumkonzentration zeigten sowohl mit Goat Antiserum als auch mit menschlichem Normalserum eine positive bzw. schwach positive Agglutinationsreaktion. Da aber die Latexpartikel mit demselben Goat Antiserum beladen worden waren, d.h. keine Antigen - Antikörper - Reaktion stattfinden konnte, mußte es sich hierbei um eine Spontanagglutination handeln. Daraus ergab sich, daß diese Latex - Reagenzien für weitere Versuche nicht geeignet waren.

Bei den Latex - Reagenzien mit höherer Antiserumkonzentration Nr.VIII und Nr.IX blieben die Agglutinationsreaktionen mit Goat Antiserum negativ. Daß auch die Agglutinationsversuche mit menschlichem Serum negativ ausfielen, obwohl hier positive Ergebnisse zu erwarten gewesen

wären, klärte sich in den anschließenden Versuchen auf.

Gegen Boratpuffer verhielten sich alle Latex - Reagenzien gleich. Nach drei Minuten war eine schwach positive Reaktion eingetreten, also genau wie es bei den vorausgegangenen Versuchen mit unbeladenen Latex - Reagenzien beschrieben wurde.

Diese beiden Latex - Reagenzien Nr. VIII und Nr. IX wurden nun auf ihr Verhalten gegenüber humanem IgG, also dem spezifischen Antigen untersucht. Es sollte festgestellt werden, bei welchen IgG Konzentrationen positive Agglutinationsreaktionen entstehen.

Geprüfte Substanzen:

1. Menschliches Normalserum von gesunden Personen.
Davon wurde eine Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:2048 hergestellt. Verdünnt wurde mit Boratpuffer.
2. 1 g% ige Lösung von Human IgG (R4) in Boratpuffer.
Davon wurde eine Verdünnung wie in 1. hergestellt.

Durchführung der Versuche:

wie in der Methode Seite 11 beschrieben

Ergebnisse: Tab.4

LR	Serum	Verdünnungen										
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
VIII	-	-	(+)	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)
IX	-	-	(+)	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)

Zu Tab.4 : Mit unverdünntem menschlichem Normalserum zeigte sich ebenso wie mit einer Verdünnung von 1:2 keine Agglutinationsreaktion. Die Verdünnung 1:4 brachte ein schwach positives Ergebnis. Im Bereich 1:8 bis 1:256 waren die Teste eindeutig positiv und ab 1:512 bis 1:2048 wieder schwach positiv. Die Ergebnisse der Latex - Reagenzien VIII und IX waren etwa gleich .

Ergebnisse: Tab.5

LR	IgG	Verdünnungen											
	1g%	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	
VIII	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	
IX	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	

Zu Tab.5 : Hier erhielten wir eindeutig positive Ergebnisse bei Verdünnungen im Bereich von 1:16 bis 1: 128. Das entspricht einer IgG Konzentration zwischen 625 µg/ml und 78,125 µg/ml. Sowohl die höheren wie die niedrigen IgG Konzentrationen ergaben etwa gleich schwach positive Agglutinationsreaktionen. Im Gegensatz zum obigen Versuch (Tab.4) zeigten hier also die Verdünnungen 1:8 und 1:256 nur schwach positive Agglutinationsreaktionen.

Alle positiven Ergebnisse in Tab.4 und Tab.5 waren nur einfach positiv, entsprachen also nicht den Erwartungen. Außerdem waren auch alle schwach positiven Ergebnisse nicht zu verwerten, da - wie aus den vorausgegangenen Versuchen bekannt - mit reinem Boratpuffer die gleiche Reaktion auftrat. Diese Tatsachen erschwerten die Beurteilung eines Testes ganz erheblich und machten dauernde Kontrollreaktionen notwendig. Im Folgenden wurde versucht, die oben genannten Schwierigkeiten mit Hilfe eines Zusatzes von Polyäthylenglykol zu beseitigen. Es wurden deshalb zwei neue Latex - Reagenzien hergestellt. Das Latex-Reagenz X enthielt die gleiche Antiserumkonzentration wie IX, das LR XI enthielt eine höhere Antiserummenge.

Herstellung der Latex - Reagenzien:

Nr.		LR X	LR XI
Polyäthylenglykol (R3)		10 mg	10 mg
Boratpuffer (R2)		0,88 ml	0,88ml
Dow - Latex (R1)		0,12 ml	0,12 ml
lyoph.Antiserum (R5)		24 mg	32 mg
(wie bei LR VI bis IX)			

Das Herstellungsverfahren wurde auf Seite 10 beschrieben.

Geprüfte Substanzen:

1. Goat Antiserum (R5)
2. Frisches menschliches Normalserum (R10)
3. Boratpuffer (R2)
4. Menschliches Normalserum von gesunden Personen.
Davon wurde eine Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:2048
hergestellt. Verdünnt wurde mit Boratpuffer.
5. 1 % ige Lösung von humanem IgG (R4) in Boratpuffer.
Davon wurde wieder eine Verdünnungsreihe wie in 4. be-
schrieben hergestellt.

Es wurden nun die gleichen Agglutinationsreaktionen wie mit
Latex - Reagenzien VI bis IX durchgeführt.

Durchführung der Versuche:

wie in der Methode Seite 11 beschrieben

Ergebnisse: Tab.6

In die Tab.6 wurden noch einmal die Ergebnisse von LR IX auf-
genommen. Die beiden Latex - Reagenzien IX und X mit gleicher
Antiserumkonzentration, aber mit (LR X) bzw. ohne (LR IX)
Polyäthylenglykol lassen sich so anschaulicher vergleichen.

LR Nr.	Ziegen Serum	Menschliches	Boratpuffer
		Normalserum	
IX	-	-	(+)
X	-	-	-
XI	-	++	-

Zu Tab.6 : Zwei Erkenntnisse konnten mit diesen Versuchen ge-
wonnen werden:

1. Wieder wurde durch den Zusatz von Polyäthylenglykol die
spontane Agglutinationsbereitschaft wesentlich herabge-
setzt.
2. Durch nochmalige Erhöhung der Antiserumkonzentration
(LR XI) erhielten wir mit menschlichem unverdünntem
Normalserum eine doppelt positive Agglutination, während
die Versuche mit LR IX und LR X negativ blieben.

Ergebnisse: Tab.7

LR hum. Verdünnungen

	Serum	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
IX	-	-	(+)	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)
X	-	-	+	++	++	++	++	+	+	(+)	-	-
XI	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+	+	(+)	-

Zu Tab.7 : Hier fiel zuerst ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Latex - Reagenzien IX (ohne) und X (mit Polyäthylenglykol) auf. Obwohl beide Reagenzien die gleiche Antiserumkonzentration enthielten, waren die Agglutinationsteste recht unterschiedlich.

1. Die Agglutinationsreaktionen mit LR X waren alle deutlicher. Im Verdünnungsbereich 1:8 bis 1:64 waren die Ergebnisse doppelt positiv. Einfach positiv waren sie bei Verdünnungen 1:4, 1:128 und 1:256. Auch das schwach positive Ergebnis bei Verdünnung 1:512 konnte noch als Nachweisreaktion angesehen werden, weil die nachfolgenden Verdünnungen 1:1024 und 1:2048 negative Ergebnisse brachten.
2. Das Latex - Reagenz X zeigte mit unverdünntem menschlichem Serum und der Verdünnung 1:2 negative Ergebnisse. Diese Tatsache, daß bei sehr hoher Antigenkonzentration die Agglutinationsreaktionen negativ ausfallen und erst nach Verdünnen positive Reaktionen zu sehen sind, wird in der Literatur als "Prozonenphänomen" bezeichnet. Durch Erhöhen der Antiserumkonzentration, was in LR XI geschah, wurden auch die Agglutinationsversuche mit unverdünntem Serum und mit der Verdünnung 1:2 doppelt positiv.
3. Bei den Versuchen mit LR XI war eine deutlich stärkere Agglutinationsreaktion zu erzielen, als bei denen mit LR X. Die Erhöhung der Antiserumkonzentration hatte sich also positiv ausgewirkt. Das Prozonenphänomen trat im untersuchten Bereich nicht mehr auf. Die Agglutinationsreaktionen waren im mittleren Bereich (Verdünnungen 1:16 bis 1:64) dreifach positiv. Mit den Verdünnungen 1:512 und 1:1024 erhielten wir noch einfach bzw. schwach positive Agglutinationsreaktionen.

Ergebnisse: Tab.8

LR	IgG 1g%	Verdünnungen											
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	
IX	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	
X	-	-	(+)	+	++	++	+	+	(+)	-	-	-	
XI	+	+	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	

Zu Tab.8 : Diese Tabelle bestätigte im wesentlichen noch einmal die in der Tab.7 enthaltenen Ergebnisse.

1. Auch hier war ein deutlicher Unterschied zwischen den LR IX (ohne) und LR X (mit Polyäthylenglykol) zu sehen. So traten bei IX auswertbare positive Nachweisreaktionen im Bereich der Verdünnungen 1:16 bis 1:128 auf. LR X dagegen brachte diese Nachweise bei Verdünnungen von 1:4 bis 1:256. Außerdem waren die Agglutinationsreaktionen mit LR X wieder deutlicher und einfacher zu beurteilen.
2. Das Prozononphänomen war wieder zu beobachten, d.h. mit LR IX und LR X erhielten wir bei 1 g% igen Lösungen von IgG und ebenso bei der Verdünnung 1:2 negative Ergebnisse. Mit LR XI waren diese Ergebnisse positiv.
3. Die positiven Agglutinationsreaktionen fielen bei LR XI im Vergleich mit denen von LR X deutlicher aus. Jedoch war der Unterschied nicht so groß, wie er bei den Versuchen mit menschlichem Serum in Tab.7 beschrieben wurde. So konnte nur bis zu einer Verdünnung von 1:128 ein doppelt positives und mit Verdünnung 1:256 ein einfach positives Ergebnis erzielt werden. Die Versuche mit den Verdünnungen 1:512 bis 1:2048 waren negativ. Mit dieser Methode können also Konzentrationen von IgG im Bereich von 10 mg/ml (1 g% ige Lösung) bis 39 µg/ml nachgewiesen werden.

3. Agglutinationsreaktionen zwischen Anti IgG und einem mit menschlichem IgG beladenen Latex - Reagenz

Ziel dieser Versuche war es, weitere Erfahrungen mit Latex - Reagenzien zu sammeln. Auch wollten wir für spätere Versuche ein brauchbares Latex-Reagenz zum Nachweis von Antikörpern gegen menschliches IgG herstellen. Deshalb wurden Latexpartikel mit menschlichem IgG beladen und ermittelt, unter welchen Bedingungen mit Antiserum gegen IgG Agglutinationsreaktionen auftraten. Es waren also die gleichen Reaktionspartner wie in den vorigen Versuchen, sie wurden nur in umgekehrter Weise eingesetzt.

Bei der ersten Versuchsreihe wollten wir noch einmal den Einfluß von Polyäthylenglykol auf die Agglutinationsreaktionen genauer untersuchen. Aus diesem Grunde wurden vier Latex - Reagenzien mit unterschiedlicher Polyäthylenglykolkonzentration hergestellt. Die IgG Konzentration war in allen vier Reagenzien gleich. Dabei wurden die Erfahrungen aus den letzten Versuchen verwertet. Das beste Latex - Reagenz XI enthielt 32 mg/ml gefriergetrocknetes Antiserum. Wir nahmen an, daß davon etwa 10 % Immunglobuline waren und wählten deshalb für die nächsten Versuche eine IgG Konzentration von 3 mg/ml Reagenz.

Herstellung der Latex - Reagenzien:

Nr.	LR XII	LR XIII	LRXIV	LR XV
Polyäthylenglykol (R3)	-	10 mg	20 mg	30 mg
Boratpuffer (R2)	0,88 ml	0,88 ml	0,88 ml	0,88 ml
Dow - Latex (R1)	0,12 ml	0,12 ml	0,12 ml	0,12 ml
Immunglobulin menschl.				
Cohn Fraktion (R4)	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg

Das Herstellungsverfahren wurde auf Seite 10 beschrieben.

Geprüfte Substanzen:

1. Boratpuffer (R2)
2. Frisches Mischserum gesunder Personen (R10)
3. Goat Antiserum to Human Immunoglobulins (IgG, IgM, IgA)
Hyland Lot No 8202V003A1 (R5)
4. Verdünnungsreihe von Goat Antiserum (1:2 bis 1:1024) (R5),
verdünnt mit Boratpuffer

Durchführung der Versuche:

wie in der Methode Seite 11 beschrieben

Ergebnisse: Tab.9 a

LR	Boratluffer	menschl.Mischserum	Goat Antiserum
XII	(+)	-	+++
XIII	-	-	+++
XIV	(+)	(+)	+++
XV	+	(+)	+++

Ergebnisse: Tab.9 b

LR	Verdünnungen von Goat Antiserum										
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
XII	++	++	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
XIII	+++	++	++	++	++	+	(+)	-	-	-	-
XIV	+++	++	++	++	++	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
XV	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+

Zu Tab.9 a und 9 b: Mit allen vier Latex - Reagenzien war ein Nachweis von Antikörpern gegen IgG in entsprechender Konzentration möglich. Die in den vorausgegangenen Versuchen ermittelte Menge von Globulinen, die an Latexpartikel angelagert werden mußte, um ein brauchbares Reagenz zu bekommen, ergab auch jetzt das gewünschte Resultat. Allerdings zeigten die verschiedenen Latex - Reagenzien einige unterschiedliche Reaktionen.

1. Bei den Agglutinationsreaktionen mit Boratluffer zeigte sich wieder, daß das LR XIII mit einer Polyäthylenglykolkonzentration von 1 g% nach drei Minuten als einziges negativ blieb und somit das beste Ergebnis lieferte. Höhere Konzentrationen von Polyäthylenglykol wie in LR XIV und LR XV brachten ebenso wie LR XII ohne Polyäthylenglykol schwach bzw. einfach positive Agglutinationsreaktionen.
2. In Tab.9a wurden die Ergebnisse der Agglutinationsversuche mit menschlichem Normalserum dargestellt. Auch hier bestätigte sich wieder, was in den vorausgegangenen Versuchen schon gesehen wurde. Das nur mit IgG beladene

Latex - Reagenz XII zeigte ebenso wie LR XIII - wie es zu fordern war - negative Agglutinationsteste. Dagegen waren die Agglutinationsversuche zwischen LR XIV und XV und frischem menschlichen Normalserum schwach positiv.

3. Auch bei den Agglutinationstesten mit Goat Antiserum gegen menschliches Immunglobulin war ein unterschiedliches Verhalten festzustellen. Wie aus Tab.9a und Tab.9b ersichtlich, konnten mit allen vier Latex-Reagenzien eindeutige Agglutinationsreaktionen im Bereich von unverdünntem Antiserum bis zu Verdünnungen von 1:64 erzielt werden. Mit dem LR XII (ohne Polyäthylenglykol) fielen alle Agglutinationsteste etwas schwächer und undeutlicher aus als bei den übrigen Reagenzien. Ab der Verdünnung 1:128 erhielten wir mit LR XII schwach positive Ergebnisse. Auf Grund der ebenfalls schwach positiven Reaktion mit reinem Boratpuffer konnte diese Reaktion nicht als Nachweis von Antikörpern betrachtet werden.

Dagegen war mit den anderen Latex - Reagenzien (XIII, XIV, XV) bei den Verdünnungen 1:128 und 1:256 ein deutlicher Unterschied zu den noch höheren Verdünnungen zu sehen und damit der Nachweis von Antikörpern gegen menschliches IgG um zwei Verdünnungsstufen empfindlicher als mit LR XII. Von Verdünnung 1:512 bis 1:2048 erhielten wir mit LR XIII negative, mit LR XIV schwach positive und mit LR XV einfach positive Agglutinationsreaktionen. Diese Ergebnisse entsprachen also jeweils denen mit reinem Boratpuffer.

Bei diesen Versuchen zeigte sich wieder, daß sich der Zusatz von 1 g% Polyäthylenglykol zu den Latex - Reagenzien günstig auf die Agglutinationsreaktionen auswirkte. Einerseits fand sich eine größere Empfindlichkeit im Vergleich mit dem Latex - Reagenz ohne Polyäthylenglykol, andererseits blieben die Agglutinationsversuche mit reinem Boratpuffer negativ, was das Beurteilen der Ergebnisse wieder sehr erleichterte. Dieser Vorteil zeigte sich besonders bei Agglutinationsreaktionen zwischen LR XIII und höheren Verdünnungen von Antiserum (1:128 bis 1:256).

Wir hielten es also für richtig, diesen Zusatz von Polyäthylenglykol in den folgenden Versuchen weiter zu verwenden.

Die vorausgegangene Versuchsreihe hatte in etwa die gewünschten Ergebnisse gebracht. Dennoch wollten wir ermitteln, welche Auswirkungen eine etwas niedrigere und eine höhere IgG Konzentration im Latex - Reagenz auf die Agglutinationsversuche hat. Deshalb wurden zwei neue Latex - Reagenzien mit jeweils einem Zusatz von 1 g% Polyäthylenglykol hergestellt und mit dem LR XIII der vorigen Versuchsreihe verglichen. Alle drei Reagenzien enthielten also die gleiche Polyäthylenkonzentration, aber unterschiedliche IgG Konzentrationen.

Herstellung der Latex - Reagenzien:

Nr.	LR XVI	LR XVII
Polyäthylenglykol (R3)	10 mg	10 mg
Boratpuffer (R2)	0,88 ml	0,88 ml
Dow - Latex (R1)	0,12 ml	0,12 ml
Immunglobuline menschl.		
Cohn Fraktion (R4)	2mg	5 mg

Das Herstellungsverfahren wurde auf Seite 10 beschrieben.

Geprüfte Substanzen:

1. Boratpuffer (R2)
2. Frisches Mischserum gesunder Personen
3. Goat Antiserum to Human Immunoglobulins (IgG, IgM, IgA)
Hyland (R5)
4. Verdünnungsreihe von Goat Antiserum (R5) von 1:2 bis
1:1024 verdünnt mit Boratpuffer

Durchführung der Versuche:

wie in der Methode Seite 11 beschrieben

Ergebnisse: Tab. 10a und Tab. 10b

Zum Vergleich wurden noch einmal die Ergebnisse von LR XIII in die Tabellen 10a und 10b aufgenommen.

Tab. 10a

LR	Boratpuffer	hum.Misch-		Goat
		serum		Antiserum
XIII	-	-	-	+++
XVI	-	-	-	+++
XVII	-	-	-	+++

Tab. 10b

LR	Verdünnungen von Goat Antiserum										
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
XIII	+++	++	++	++	++	++	+	(+)	-	-	-
XVI	+++	++	++	++	++	++	+	(+)	-	-	-
XVII	+++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-

Zu Tab. 10a und Tab. 10b: Die Agglutinationsversuche mit den drei Latex-Reagenzien XIII, XVI, XVII entsprachen sich - wie aus den obigen Tabellen ersichtlich - fast vollständig. Zwei Schlußfolgerungen waren daraus zu ziehen:

1. Die Änderung der IgG Konzentration in dem von uns gewählten Bereich hatte nur einen geringen Einfluß auf die Agglutinationsergebnisse.
2. Durch die Erhöhung der IgG Konzentration auf 5 mg/ml Latex - Reagenz wurde die Empfindlichkeit etwas herabgesetzt.

4. Agglutinationsreaktionen zwischen Latex - Reagenzien, die mit Kaninchen IgG - Anti M1 beladen wurden und Präparaten aus menschlichem Myocard

Nachdem die in den vorausgehenden Abschnitten beschriebenen vorbereitenden Versuche abgeschlossen waren, konnten jetzt die von NOWY isolierten Substanzen untersucht werden.

Es standen zwei Reagenzien zur Verfügung:

1. Gefriergetrocknete Fraktionen aus menschlichem Myocard " M1 " (R6)
2. Gefriergetrocknetes γ -Globulin eines Kaninchens, das mit der Substanz M1 immunisiert worden war, " Anti M1 " (R7)

Unsere Aufgabe war es jetzt, das Anti M1 (R7) an Latexpartikel anzulagern. Dann wollten wir untersuchen, ob spezifische Agglutinationsreaktionen zwischen diesen Latex - Reagenzien und den Präparaten aus menschlichem Myocard (R6) möglich sind. Deshalb wurden zunächst vier Latex - Reagenzien mit unterschiedlicher Anti M1 Konzentration hergestellt. Auf Grund der guten Erfahrungen in den vorausgegangenen Versuchen verwendeten wir bei allen vier Reagenzien einen Zusatz von 1 g% Polyäthylenglykol.

Herstellung der Latex - Reagenzien:

Nr.	LR XVIII	LR XIX	LR XX	LR XXI
Polyäthylenglykol (R3)	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg
Boratpuffer (R2)	0,88 ml	0,88 ml	0,88 ml	0,88 ml
Dow - Latex (R1)	0,12 ml	0,12 ml	0,12 ml	0,12 ml
IgG Anti M1 (R7)	12 mg	20 mg	30 mg	40 mg

Das Herstellungsverfahren wurde auf Seite 10 beschrieben,

Geprüfte Substanzen:

1. Boratpuffer (R2)
2. Frisches menschliches Normalserum
3. M1 (E₇₋₁₁), (R6)
4. Von Nr.3 wurde mit Hilfe von Boratpuffer eine Lösung mit einer Eiweißkonzentration von 1 g% hergestellt. Von dieser Lösung ausgehend wurde dann eine Verdünnungsreihe (1:2 bis 1:1024) mit Boratpuffer hergestellt.

Durchführung der Versuche:

wie in der Methode Seite 11 beschrieben

Ergebnisse: Tab. 11a

LR	Boratpuffer	Normalserum menschl.	M1
XVIII	-	-	-
XIX	-	-	-
XX	-	-	-
XXI	-	-	-

Ergebnisse: Tab. 11b

LR	Verdünnungen von M1									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
XVIII	-	-	-	-	-	$-\text{/(+)}^*$	$-\text{/(+)}^*$	-	-	-
XIX	-	-	-	-	(+)	++	+	-	-	-
XX	-	-	-	+	++	++	+	-	-	-
XXI	-	-	-	-	++	++	(+)	-	-	-

* Diese Ergebnisse wurden nach vier Minuten abgelesen

Zu Tab. 11a und Tab. 11b: Folgende Beobachtungen wurden bei diesen Versuchen gemacht:

1. Alle vier Latex - Reagenzien blieben bei den Agglutinationsversuchen mit reinem Boratpuffer länger als 5 Minuten negativ.
2. Auch mit frischem menschlichem Normalserum erbrachten die vier Latex - Reagenzien gleichmäßig negative Ergebnisse.
3. Bei den Agglutinationsversuchen mit dem spezifischen Antigen M1 und dessen Verdünnungen waren zwischen den Reagenzien einige wesentliche Unterschiede zu sehen. Als bestes erwies sich LR XX. Bei den Agglutinationsversuchen zwischen diesem und M1 bei Verdünnungen von 1:32 und 1:64 erhielten wir doppelt positive Ergebnisse. Mit der Verdünnung 1:128 und 1:16 waren die Agglutinationsreaktionen einfach positiv. Die anderen Latex-Reagenzien zeigten deutlich schlechtere Ergebnisse.

Unter der Voraussetzung, daß es sich bei den erhaltenen Agglutinationsreaktionen um spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen zwischen M1 und Anti M1 handelt, können An-

gaben über die Empfindlichkeit gemacht werden. Wir waren von einer 1 g% igen Eiweißkonzentration in der Lösung M1 ausgegangen. Positive Reaktionen erhielten wir von Verdünnung 1:16 bis 1:128. Daraus kann errechnet werden, daß Nachweisreaktionen im Bereich der M1 Konzentrationen von 625 µg/ml bis 78,1 µg/ml möglich sind.

Da das Latex - Reagenz XX in etwa den Erwartungen entsprach, wurde in den folgenden Versuchen damit weitergearbeitet.

5. Versuche, mit denen nachgewiesen wurde, daß bei den vorangehenden Agglutinationsreaktionen Antigen - Antikörper - Reaktionen zwischen M1 und Anti M1 stattfanden

Nun mußte die Frage geklärt werden, ob es sich bei den gesehenen Agglutinationsreaktionen wirklich um Reaktionen zwischen dem Präparat M1 und Anti M1 handelte. Dies war zu untersuchen, da eine Trennung von M1 und IgG wahrscheinlich nicht vollständig geschehen konnte und deshalb mit einer entsprechenden Verunreinigung des M1 Präparats zu rechnen war. Daraus ergibt sich, daß das durch Immunisieren von Kaninchen gewonnene Präparat Anti M1 auch Antikörper gegen menschliches IgG enthalten konnte.

Aus diesem Grund mußte zuerst untersucht werden, ob Agglutinationsreaktionen zwischen dem Latex - Reagenz XX und menschlichem IgG möglich sind.

Geprüfte Substanzen:

1. 1 g% ige Lösung von IgG (R4) in Boratpuffer
2. Verdünnungen davon von 1:2 bis 1:2048

Durchführung der Versuche:

wie in der Methode Seite 11 beschrieben

Ergebnisse: Tab. 12

LR IgG Verdünnungen

1g%Lös. 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256 1:512 1:1024 1:2048

XX - - - - - - - - - - - -

Zu Tabelle 12: Alle Agglutinationsversuche blieben negativ. Daraus war zu schließen, daß die Konzentration von Antikörpern gegen IgG im LR XX zu gering war um eine Agglutination zu bewirken. Alle positiven Agglutinationsreaktionen, die mit LR XX erzielt wurden, mußten also Reaktionen zwischen M1 und Anti M1 gewesen sein.

Nun wollten wir versuchen, ob es möglich ist, einmal im Präparat M1 das nicht abgetrennte IgG, zum anderen im Präparat Anti M1 das beim Immunisieren entstandene Anti IgG mit Hilfe der entsprechenden von uns hergestellten Latex - Reagenzien nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurde auf die in den Vorversuchen hergestellten Latex - Reagenzien XI zum Nachweis von menschlichem IgG und XIII zum Nachweis von Anti -IgG zurückgegriffen. Zwei Versuchsreihen mußten durchgeführt werden. Zunächst wurde das Präparat M1 untersucht.

Herstellung der Latex - Reagenzien:

Verwendet wurde LR XI, das auf Seite 18 beschrieben wurde.

Geprüfte Substanzen:

1. 1 g% ige Lösung (vom Eiweißgehalt ausgehend)
von M1 in Boratpuffer
2. Verdünnung davon im Bereich von 1:2 bis 1:2048 mit
Boratpuffer

Durchführung der Versuche:

wie in der Methode Seite 11 beschrieben

Ergebnisse: Tab. 13

LR M1 Verdünnungen

1g%	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
XI	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zu Tab. 13: Das mit Antiserum gegen menschliches IgG beladene LR XI zeigte sowohl mit der 1g% igen Lösung wie mit der 1:2 verdünnten eine positive Agglutinationsreaktion. Alle weiteren Verdünnungen reagierten negativ. Der Nachweis von geringen Mengen IgG in dem Präparat M1 konnte somit als positiv angesehen werden.

Als nächstes wurde das Präparat Anti M1 untersucht.

Herstellung der Latex - Reagenzien:

Verwendet wurde das LR XIII, das auf Seite 21 beschrieben wurde.

Geprüfte Substanzen:

1. 2 g% ige Lösung von Anti M1 in Boratpuffer
2. 1 g% ige Lösung von Anti M1 in Boratpuffer
3. Verdünnungen davon im Bereich von 1:2 bis 1:2048 mit Boratpuffer

Durchführung der Versuche:

wie in der Methode Seite 11 beschrieben

Ergebnisse: Tab. 14

LR Anti M1 Verdünnungen

2g% 1g% 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256 1:512 1:1024 1:2048

XIII ++ (+) (+) - - - - - - - - - -

Zu Tab. 14: Das Latex - Reagenz XIII war mit menschlichem IgG beladen und mußte bei einer geeigneten Konzentration von Anti IgG agglutinieren. Wir erhielten mit der 2 g% igen Lösung von Anti M1 ein doppelt positives, mit der 1 g% igen Lösung und der Verdünnung 1:2 ein schwach positives Testergebnis. Die Agglutinationsversuche mit allen weiteren Verdünnungen fielen negativ aus. Diese Ergebnisse berechtigten uns zu der Annahme, daß in dem Präparat Anti M1 geringe Mengen von Anti IgG enthalten waren.

Aus den letzten drei Versuchsreihen ergab sich, daß M1 nachweisbare Mengen an IgG und Anti M1 auch Anti IgG enthielten. Die Mengen waren jedoch so gering, daß die Agglutinationsreaktion M1 / Anti M1 nicht merklich beeinflußt wurde.

6. Prüfung der Organspezifität des Reagenz M1

Das Präparat M1 war aus menschlichem Myocard gewonnen worden. Mit M1 wurden Kaninchen immunisiert und so entsprechende Antikörper erzeugt. Wir untersuchten nun, ob sich in anderen menschlichen Organen Proteine mit gleichem Verhalten in Bezug auf die von uns durchgeführten Agglutinationsteste fanden. Deshalb wurden auf gleiche Weise hergestellte Extrakte aus menschlicher Leber, menschlichem Muskelgewebe (M.psoas) und menschlichem Herzmuskelgewebe auf ihr Verhalten gegenüber den oben genannten Antikörpern getestet, ebenso menschliches Normalserum.

Herstellung der Latex - Reagenzien:

Für diese Versuche wurde LR XX verwendet, das auf Seite 26 beschrieben wurde.

Geprüfte Substanzen:

1. Menschliches Normalserum, Verdünnung davon im Bereich von 1:2 bis 1:2048 mit Boratpuffer
2. 1 % ige Lösung des Leberextraktes (R8) in Boratpuffer, Verdünnungen davon im Bereich von 1:2 bis 1:2048 mit Boratpuffer
3. 1 % ige Lösung des Muskelextraktes (R9) in Boratpuffer, Verdünnungen davon im Bereich von 1:2 bis 1:2048 mit Boratpuffer
4. 1 % ige Lösung von Herzmuskelextrakt (R10) in Boratpuffer, Verdünnungen davon im Bereich von 1:2 bis 1:2048 mit Boratpuffer

Durchführung der Versuche:

wie in der Methode Seite 11 beschrieben

Ergebnisse: Tab. 15

LR	Serum	Verdünnungen											
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	
XX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Leber	Verdünnungen											
	1g%												
XX	++	++	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Muskel	Verdünnungen											
	1g%												
XX	(+)	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Herz	Verdünnungen											
	1g%												
XX	(+)	++	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	

Zu Tab.15: Alle Agglutinationsversuche zwischen dem mit Anti M1 beladenen LR XX und normalem menschlichem Serum bzw. dessen Verdünnungen mit Boratpuffer blieben negativ. Die anderen drei Versuchsreihen brachten etwa gleiche Ergebnisse. Im Bereich von 1 g% igen Lösungen bis zu den Verdünnungen 1:8 erhielten wir immer positive Agglutinationsreaktionen. Diese fielen verschieden aus, von schwach bis doppelt positiv. Alle höheren Verdünnungsstufen ergaben mit LR XX negative Agglutinationsteste. Daraus kann geschlossen werden, daß sowohl in der Leber wie im Skelett- bzw. Herzmuskelgewebe in Bezug auf das Agglutinationsverhalten gegen Anti M1 gleiche Substanzen in etwa gleicher Konzentration vorkommen. Eine Organspezifität der Substanz M1 ist also nicht gegeben.

7. Seren verschiedener Patienten werden auf ihr Verhalten gegenüber Anti M1 untersucht

Da normales Serum mit dem mit Anti M1 beladenen Latex - Reagenz nicht reagierte, wollten wir das Verhalten verschiedener Patientenserum prüfen.

7. 1 25_unausgewählte_Seren_stationärer_Patienten

Herstellung des Latex - Reagenz:

Für diese Versuche wurde LR XX verwendet, das auf
Seite 26 beschrieben wurde.

Geprüfte Substanzen:

Serum von 25 stationären Patienten unverdünnt

Durchführung der Versuche:

wie in der Methode Seite 11 beschrieben

Ergebnisse: Tab. 16

von den 25 Seren reagierten: 23 negativ
1 einfach positiv
1 dreifach positiv

Zu Tab.16: In den Versuchen wurde erkannt, daß es neben negativ reagierenden Seren auch positive gibt. Beim Durchsehen der Laborwerte des Kranken mit dreifach positiver Agglutinationsreaktion fiel auf, daß hier auch ein dreifach positiver Rheumafaktor (Latex-Tropfentest) festgestellt worden war. Deshalb wurden die nachfolgenden Versuche durchgeführt.

7. 2 Seren von Patienten mit dreifach positivem Rheumafaktor werden auf ihr Verhalten gegen Anti M1 geprüft

Es standen sechs Patientenseren mit dreifach positivem Rheumafaktor zur Verfügung. Diese wurden nun mit unserem mit Anti M1 beladenen Latex - Reagenz XX getestet.

Herstellung des Latex - Reagenz:

Für diese Versuche wurde LR XX verwendet, das auf
Seite 26 beschrieben wurde.

Geprüfte Substanzen:

Seren von sechs Patienten mit dreifach positivem
Rheumafaktor, unverdünnt

Durchführung der Versuche:

wie in der Methode Seite 11 beschrieben

Ergebnisse: Tab. 17

von den sechs Seren reagierten	2	einfach positiv
	3	doppelt positiv
	1	dreifach positiv

Zu Tab.17: Alle sechs Seren reagierten bei unseren Agglutinationsversuchen positiv, allerdings in unterschiedlicher Stärke. Diese positive Reaktion läßt sich so klären: Beim Rheumafaktor handelt es sich um Antikörper, die sowohl mit menschlichem IgG wie mit artfremden IgG reagieren. In unserem Fall hat also der Rheumafaktor mit dem Kaninchen IgG reagiert. Eine spezifische Reaktion zwischen M1 und Anti M1 fand also nicht statt.

7. 3 Seren von Infarktpatienten werden auf ihr Verhalten gegen Anti M1 untersucht

Das Präparat M1 wurde aus menschlichem Myocard gewonnen. Es wäre nun vorstellbar, daß bei einem Myocardinfarkt geringe Mengen M1 freigesetzt würden, die man dann nachweisen könnte. Deshalb wurden verschiedene Infarktseren mit unserem Reagenz untersucht.

Herstellung des Latex - Reagenz

Für diese Versuche wurde LR XX verwendet, das auf
Seite 26 beschrieben wurde

Geprüfte Substanzen:

Es wurden Seren von Patienten mit frischen Myocardinfarkten untersucht. Die CPK Werte lagen zwischen 200 und 1000 IE. Von zwei dieser Patienten wurden die Seren vom ersten bis zum fünften Tag nach dem Infarkt getestet.

Durchführung der Versuche:

wie in der Methode Seite 11 beschrieben

Ergebnisse:

alle Seren zeigten negative Agglutinationsreaktionen.

Aus obigen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß mit dem von uns hergestellten Latex - Reagenz unter den hier gegebenen Bedingungen ein Infarktserum nicht von einem Normalserum zu unterscheiden ist. Wahrscheinlich reicht die im Serum vorhandene Menge an freigesetztem Protein aus dem Myocard nicht aus, um diese mit der von uns gewählten Methode erfassen zu können.

IV. DISKUSSION

1. Über den Latex - Test

Erstmals wurde 1956 von SINGER und PLOTZ [22] ein Latextest zur Diagnostik von chron.rheumatischen Erkrankungen verwendet. Sie führten ihre Versuche in Reagenzgläsern durch. 1957 beschrieben RHEINS et al [20] einen Latex - Tropfentest, der in Röhrchen durchgeführt wurde. Der Schritt zum heute vielfach verwendeten Latex - Objektträgertest war dann nicht mehr weit. Mit dieser Methode werden heute RF - Tests, ASL - Tests, CRP, Schwangerschaftsschnellteste und andere durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine recht elegante und zudem empfindliche Nachweisreaktion. Beispielsweise können bei Schwangerschaftstesten [24] noch Choriongonadotropinmengen im Urin von 1 IE/ml, d.h. ca. 0,1 µg/ml nachgewiesen werden.

Der erste Teil unserer Arbeit hatte zum Ziel, Erfahrungen mit der Herstellung von Latexreagenzien und der Durchführung der Agglutinationsversuche zu sammeln. Zunächst untersuchten wir das Verhalten von unbeladener Latexlösung, danach beluden wir die Latexpartikel und machten mit diesen Reagenzien Versuche. Als Antigene und Antikörper wählten wir menschliches IgG und Anti IgG von der Ziege. Bei einer Versuchsreihe wurden die Latexpartikel mit Anti IgG beladen und die Reaktion mit IgG beobachtet. Bei der anderen wurde umgekehrt verfahren. Aus diesen drei Versuchsreihen wurden folgende wesentliche Erkenntnisse gewonnen:

1. Unbeladenes Latexreagenz zeigte bei Agglutinationsversuchen sowohl mit Boratpuffer allein als auch mit frischem Humanserum eine positive Agglutinationsreaktion, wobei letztere wesentlich stärker ausfiel (Tab.1). Mit inaktiviertem Serum blieb die Agglutinationsreaktion negativ. Dies läßt sich vielleicht so erklären: bei der ersten Reaktion handelt es sich um eine Spontanagglutination der Latexpartikel in der Pufferlösung. Diese Spontanagglutination wird durch das im frischen Serum vorhandene Komplement verstärkt. Beim Fehlen dieses Komplements, wie es im inaktivier-

ten Serum der Fall ist, werden die Latexpartikel durch die im Serum befindlichen Eiweißmoleküle, die sich an der Oberfläche der Partikel anlagern, an einer Spontanagglutination gehemmt. Der Einfluß von Polyäthylenglykol auf diese Reaktion wird in einem eigenen Kapitel besprochen.

2. Bei der zweiten Versuchsreihe konnte gezeigt werden, daß ein Nachweis von IgG mit Hilfe von mit Anti IgG beladenen Latexreagenzien möglich ist. Auch die Empfindlichkeit unseres Testes konnte hier ermittelt werden. Zu diesem Zweck war mit IgG eine Verdünnungsreihe hergestellt worden. Wir erhielten sicher positive Agglutinationsreaktionen bei Verdünnungen unserer 1 %igen Lösung bis 1:256. Das heißt, die Lösungen mit einer IgG - Konzentration von 10 mg/ml bis 39 µg/ml ergaben bei unseren Tests positive Nachweisreaktionen (Tab.8). Wurden die Agglutinationsversuche mit menschlichem Normalserum durchgeführt (Tab.7), erhielten wir prinzipiell die gleichen Ergebnisse, allerdings ergab noch eine weitere Verdünnungsstufe eine positive Agglutinationsreaktion. Der Grund hierfür ist nicht bekannt. Ein anderer Serumbestandteil könnte eine Rolle spielen, oder es könnte auch ein Teil des IgG Präparates denaturiert sein und somit keine Antigen - Antikörper - Reaktion mehr eingehen. Die umgekehrten Versuche (Tab.9, Tab.10), bei denen die Latexpartikel mit menschlichem IgG beladen wurden und Agglutinationsversuche mit Antiserum von der Ziege angestellt wurden, erbrachten in Bezug auf die Empfindlichkeit der Reaktion entsprechende Ergebnisse.
3. Bei den Latexreagenzien mit geringerer IgG Beladung (Tab.8, LR X) konnte das sogenannte Prozonphänomen beobachtet werden. Bei hoher Anti - IgG Konzentration fielen die Agglutinationsreaktionen negativ aus, während sie bei niedrigeren Konzentrationen positiv waren. Dieses Verhalten war schon von SINGER und PLOTZ[22] beobachtet worden. Durch Erhöhen der IgG Konzentration im Latexreagenz konnte dieses Verhalten in dem von uns untersuchten Bereich zum Verschwinden gebracht werden. Allerdings scheint dadurch die Empfindlichkeit im Bereich niedriger IgG Konzentration etwas geringer zu werden (Tab.10).

2. Polyäthylenglykol

Bei der Beurteilung von Agglutinationsergebnissen ergaben sich immer wieder Schwierigkeiten, vor allem in den Grenzbereichen, sei es, daß das nachzuweisende Protein in sehr geringer oder in sehr hoher Konzentration in der untersuchten Lösung enthalten war. Da bei Agglutinationsversuchen auch ohne daß in der Lösung die nachzuweisenden Proteine vorhanden waren, nach 2 - 3 Minuten schwache Agglutinationsreaktionen auftraten, konnten schwach positive Reaktionen auf Grund von Antigen - Antikörper - Reaktionen nicht von den falsch positiven unterschieden werden. Deshalb suchten wir nach einer Möglichkeit, diese falsch positiven Reaktionen zu verhindern ohne die Antigen - Antikörper - Reaktion zu beeinträchtigen. Einer Anregung von NOWY folgend wurde Polyäthylenglykol untersucht. Unseres Wissens wurde diese Substanz noch nie einem Latexreagenz zugemischt. GERSON et al [6] hatten die Wirkung von Humanserum, inaktiviertem Humanserum und Serumalbumin auf Latexreaktionen untersucht und eine Stabilisierung, gleichzeitig aber auch eine Hemmung der Reaktion erhalten. Diese Versuche muß man vielleicht in Analogie zu dem Beimischen von Rinderalbumin bei Blutgruppenuntersuchungen sehen. Nach POLLACK et al [19] wird durch das Rinderalbumin das sogenannte zeta - Potential der Erythrocyten verändert, d.h. die Kräfte, die überwunden werden müssen, um die Erythrocyten zu aggregieren, werden verringert. Ähnliches könnte auch mit den Latexpartikeln geschehen, wenn dem Latexreagenz Polyäthylenglykol zugemischt wird. Diese Frage wurde von uns jedoch nicht näher untersucht. Sicher ist, daß die vergleichenden Versuche mit den Latex - Reagenzien IX und X, außerdem XII, XIII, XIV und XV eindeutig erkennen ließen, daß die Latex - Reagenzien mit Polyäthylenglykol empfindlicher reagieren.

Auf der einen Seite fielen die positiven Agglutinationsreaktionen deutlicher aus (Tab.7, 8, 9), auf der anderen Seite konnten noch bei geringeren Proteinkonzentrationen eindeutig positive Ergebnisse erzielt werden (Tab. 7, 8, 9). Letzteres machte bei der von uns gewählten Verdünnungsreihe 1 - 2 Verdünnungsstufen aus und stellte damit eine deutliche Verbesserung dar. Bei verschiedenen Polyäthylenglykolkonzentrationen erwies sich die 1 g% Lösung als besonders günstig (Tab.2, 9).

Negative Auswirkungen des Polyäthylenglykol wie etwa eine Reaktionshemmung oder falsch positive Reaktionen konnten in keinem Fall beobachtet werden. Deshalb stellten wir die weiteren Latex - Reagenzien mit einem Zusatz von Polyäthylenglykol her.

3. Über die Substanzen M1 und Anti - M1

1. Es ist uns gelungen, mit der Substanz Anti - M1 Latexpartikel zu beladen und so ein brauchbares Latexreagenz herzustellen. Mit diesem Reagenz konnte eine Antigen - Antikörper - Reaktion zwischen M1 und Anti - M1 sichtbar gemacht werden (Tab.11). Aus dieser Tabelle läßt sich auch die Empfindlichkeit des besten Latex-Reagenz (Nr. XX) ermitteln. Positive Agglutinationsreaktionen erhielten wir bei Versuchen mit Lösungen in denen eine M1 - Konzentration zwischen 625 µg/ml und 78 µg/ml enthalten war. Die Ergebnisse entsprachen den in den Vorversuchen gemachten Beobachtungen. Wir sahen hier wieder das sog. Prozonenphänomen in einem ausgeprägteren Maße.

Um sicherzustellen, daß die positiven Agglutinationsreaktionen in Tab.11 nicht durch andere bei den Vorversuchen vorhandene Antigene und Antikörper zustande kamen, mußten die in Tab.12 und Tab.13 dargestellten Versuche gemacht werden.

2. Über die Organspezifität der Substanz M1

Alle entsprechenden Versuche zeigten, daß eine Organspezifität der untersuchten Substanz M1 nicht gegeben ist. Zwar konnte die Substanz im normalen menschlichen Serum mit unserer Methode nicht nachgewiesen werden (Tab.13), aber in Extrakten aus menschlicher Leber und menschlichem Skelettmuskel kommt die Substanz in etwa gleicher Konzentration vor, wie im Myocard (Tab.13). Somit wäre ein selektiver Nachweis einer Myocarderkrankung auch dann nicht möglich, wenn im Serum des Patienten nachweisbare Mengen von M1 auftreten würden. Die Substanz M1 ist also in der vorliegenden Form zum Nachweis einer Myocarderkrankung nicht geeignet. Dagegen wäre ein unspezifischer Nachweis von Organeisweiß, etwa von Leber und Skelettmuskulatur, mit dem verwendeten Reagenz möglich, wenn die Empfindlichkeit z.B. durch ein potenteres Antiserum gesteigert werden könnte.

Eine wirklich spezifische Substanz für das Myocard, d.h. eine Substanz, die in keiner anderen Zelle des gleichen Organismus vorkommt, ist schwerlich zu erwarten, wenn man bedenkt, daß alle Zellen des Körpers den gleichen Genbesatz haben. Auch bei den in der Diagnostik verwendeten Enzymen kann nur aus Enzymmustern und entsprechenden Verläufen auf die Erkrankung eines Organs geschlossen werden. Dabei besteht häufig eine erhebliche Unsicherheit. Neuere Arbeiten [12, 16] über die CPK - Isoenzyme haben gezeigt, daß die Verteilung der Isoenzyme in den einzelnen Organen recht unterschiedlich ist und daß das Isoenzym CK - MB in hoher Konzentration nur im Myocard vorkommt. Ob der Nachweis von Isoenzym CK - MB im Serum Erkrankter den erhofften Erfolg bringt, d.h. die Myocarderkrankung sicher beweisen oder ausschließen kann, müssen Arbeiten in den kommenden Jahren zeigen. In letzter Zeit wurde von der Fa. Merck (Darmstadt) ein Test zum Nachweis der CK - MB entwickelt. Dabei wird CK - MM durch ein entsprechendes Antiserum, das im Substrat enthalten ist, eliminiert. Das von uns verwendete Anti - M1 enthält u.a. gleichfalls Anti-CK-MM [18].

3. Über die Beziehung zum Rheumafaktor

Wir haben nur eine geringe Anzahl von Patientenserum untersucht (Tab.16, 17). Diejenigen Seren, die eine positive Agglutinationsreaktion zeigten, hatten gleichzeitig einen positiven Rheumafaktor. Damit ist eine Erklärung für den positiven Ausfall unserer Latexagglutinationsteste unschwer möglich. Die Agglutinationen fanden statt auf Grund einer Reaktion zwischen den Rheumafaktoren in den Patientenserum und dem IgG vom Kaninchenserum mit dem wir die Latexpartikel beladen hatten [10]. Es wurde also nur der Rheumafaktor nachgewiesen und es fand keine Antigen - Antikörper - Reaktion zwischen der Substanz M1 und Anti M1 statt. D.h. also, bei einem solchen Test müßte der Rheumafaktor vorher eliminiert werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Unsere Aufgabe war es, die Frage zu beantworten, ob es möglich ist, mit Hilfe eines Latex-Objekträgertests eine Antigen - Antikörper - Reaktion zwischen einer aus menschlichem Herzmuskelgewebe isolierten Proteingruppe und den entsprechenden Antikörpern in Kaninchenserum makroskopisch sichtbar nachzuweisen. Diese Versuche gelangen und wir konnten sowohl die notwendige Proteinkonzentration für die Herstellung des Latex - Reagenz als auch die geringste noch nachweisbare Konzentration der Proteine in der untersuchten Lösung ermitteln. Der zweite Teil unserer Untersuchung zeigte, daß eine Spezifität der aus Myocard isolierten Proteine nicht gegeben ist. Zwar kommen diese im Serum von Normalpatienten nicht oder in nicht nachweisbarer Menge vor, jedoch erhielten wir mit Fraktionen aus Leber und Skelettmuskel gleiche Reaktionen wie mit solchen aus Myocard. Eine Organspezifität ist somit ausgeschlossen, aber es besteht die Möglichkeit eines unspezifischen Nachweises von Organeiweiß im Serum. Ob die von uns untersuchte Proteingruppe bei bestimmten Erkrankungen in nachweisbarer Menge im Serum vorkommt, konnte durch unsere Arbeit weder bewiesen noch ausgeschlossen werden. Nur wenige Seren wurden untersucht und diejenigen, die positiv ausfielen, hatten gleichzeitig einen positiven Rheumafaktor. Da wir Kaninchenantiserum verwendet haben, handelt es sich dabei um eine Reaktion zwischen dem Rheumafaktor im menschlichen Serum und dem IgG des Kaninchenserums. Zum Nachweis von Organeiweiß auf dieser Basis müßte also der Rheumafaktor vorher eliminiert werden. Da wir bei vielen Agglutinationsversuchen mit dem erhaltenen Ergebnis nicht zufrieden waren, suchten wir nach einer Verbesserung und kamen dabei auf Polyäthylenglykol, das wir dem Latex - Reagenz zumischten. Es zeigte sich, daß besonders in Grenzbereichen die Agglutinationsergebnisse wesentlich eindeutiger ausfielen und noch bei geringeren Proteinkonzentrationen in der untersuchten Lösung ein Nachweis möglich war.

VI. LITERATUR

1. ARNOLD, H., HOFFMANN, A., BLUME, K.G., ENGELHARDT, R., LÖHR, G.W.:
Zur Frage gewebsspezifischer Isoenzyme der Glucosephosphat-
isomerase des Menschen
Klin.Wschr.52, 149 - 151 (1974)
2. ATCHLEY, W.A., BHAGAVAN, N.V. and MASOUREDIS, S.P.:
Influence of Ionic Strength on the Reaction Between Anti - D
and D Positive Red Cells
J.Immunol. 93, 701 - 712 (1964)
3. EHRENFELD, E.N., GERY, I. and DAVIES, A.M.:
Specific Antibodies in Heart - Disease
Lancet, 1138 - 1141 (1961)
4. ESPINOSA, E. and KAPLAN, M.H.: Antigenic Analysis of Human Heart
Tissue. Identification of Antigens with Specificity Restricted to
Heart and Skeletal Muscle in Acid Extracts of Myocardium.
J. Immunol.5, 1020 - 1031 (1968)
5. GELD van der, H.: Anti - Heart Antibodies in the Postpericardio-
tomy and Postmyocardial - Infarction Syndromes.
Lancet 2, 617 - 621 (1964)
6. GERSON, C.B. and TALMAGE, D.V. : The Demonstration of Three Types
of Inhibitors and one Typ of Stabilizer of the Latex Fixation Test
for Rheumatoid Arthritis. J.Clin.Invest. 972 (1960)
7. GERY, I., DAVIES, A.M., EHRENFELD, E.N.: Heart - Specific Auto-
antibodies. Lancet, 471 - 472 (1960)
8. GROVE - RASMUSSEN, M. and SOUTTER, L.: The Necessity for Adding
Albumin to Serum In Crossmatching. New Eng.J.Med.248, 149 - 151(1953)
9. HESS, E.V., FINK, C.W., TARANTA, A. and ZIFF, M.: Heart Muscle Anti-
bodies in Rheumatic Fever and other Diseases.
J.Clin.Invest.43, 886 - 893 (1964)
10. HUMPHREY, J.H., WHITE, R.G. :
Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Stuttgart 1972
11. KAGEN, L.J.: Immunologic Detection of Myoglobinuria after Cardiac
Surgery. A.Int.Med.67, 1183 - 1188 (1967)
12. KONTTINEN, A., AUVINEN, S. and SOMER, H. :
Reliability of Serum Isoenzyme. Determinations in the Diagnosis
of Myocardial Infarction.
Clin.Chim.Acta 52, 245 - 247 (1974)

13. LUGINBUHL, W.H.: Immunologic Investigation of Preparations of Human Myoglobin. *Am.J.Clin.Path.*38, 487 - 493 (1962)
14. MARSTERS, R.W. and SCHLEIN, F.C.: An Evaluation of several Commercial Preparations of Albumin in Blood Bank Practice. *Am.J.Clin.Path.*32, 481 - 488 (1959)
15. MATHIES, H. und GAEDICKE, H.: Die Latex - ASL - Reaktion zur groben Differenzierung normaler und pathologischer Antistrep-tolysintiter., *Med.Klinik* 5, 165 - 167 (1968)
16. NEUMEIER, D. und KNEDEL, M.: Immunologischer Nachweis von Creatinkinase - MB im Serum beim Myocardinfarkt. *Klin.Wschr.*53, 329 - 333 (1975)
17. NOWY, H.: An Antiserum Against a Group of Human Myocardial Proteins. *Actas del VI Congreso Europeo de Cardiologia*, Madrid 1972
18. NOWY, H. : Persönliche Mitteilungen
19. POLLACK, W. and RECKEL, R.P.: The Zeta Potential and Hemagglutination with Rh Antibodies. *Int.Arch.Allergy* 38, 482 - 496 (1970)
20. RHEINS, M.S., MCCOY, F.W., BURRELL, R.G. and BUELER, U.: A Modification of the Latex - Fixation Test for the Study of Rheumatoid Arthritis. *J.Lab.Clin.Med.*50, 113 (1957)
21. SARANCHAK, H.J. and BERNSTEIN, S.H.: A new Diagnostic Test for Acute Myocardial Infarction. The Detection of Myoglobinuria by Radioimmunoassay. *JAMA* 228, 1251 - 1255 (1974)
22. SINGER, J.M. and PLOTZ, C.M.: The Latex Fixation Test. I. Application to the Serologic Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *Am.J.Med.*21, 888 - 891 (1956)
23. SINGER, J.M., PLOTZ, C.M., PADER, E. and ELSTER, S.K.: The Latex Fixation Test. III. Agglutination Test for C - Reactive Protein and Comparison with the Capillary Precipitin Method. *Am.J.Clin.Path.*28, 611 - 617 (1957)
24. TAMAOA, T., MARUJAMA, M. and MATSUMOTO, S.: Qualitative and quantitative Studies on a new Pregnancy Test by Latex Direct Agglutination Reaction. *Int.J.of Fertility* 16, 101 - 106 (1971)
25. WIEDERMANN, G.: Der Latextest in der Bakteriologie und Serologie *Zentralblatt für Bakteriologie I Orig* 187, 278 - 283 (1962)

Herrn Prof.Dr. Nowy danke ich für die Überlassung des Themas
und seine großzügige Unterstützung.

L e b e n s l a u f

Am 31.12.1944 wurde ich, Gerhard Giebl, als Sohn des Wagnermeisters Ludwig Giebl und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Schmid, in Bad Rippoldsau geboren. Nach 5-jährigem Besuch der Volksschulen in Bad Rippoldsau und Parsdorf wechselte ich 1956 in die Oberrealschule Erding über. 1963 begann ich eine Lehre als Elektromechaniker und legte 1967 die Gesellenprüfung ab. Den Beruf als Elektromechaniker übte ich bis 1969 aus. 1966 trat ich in das Abendgymnasium für Berufstätige in München ein. Nach bestandener Reifeprüfung 1970 begann ich das Medizinstudium an der Universität München, legte nach dem WS 1972/73 das Physikum und im Sommer 1976 das Staatsexamen ab. Daran anschließend war ich als Medizinalassistent acht Monate in Erding tätig. Zur Zeit arbeite ich im Klinikum Rechts der Isar in München. Seit 1973 bin ich verheiratet. Ich habe zwei Kinder.

